

© Данилов М.О.

УДК: 615.277.3:616-018:612.35

Данилов М.О., Линчак О.В., Островская Г.В., Рыбальченко В.К.

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології" (вул. Володимирська, 64/13, м. Київ, 01601, Україна)

ПОРІВНЯННЯ ВПЛИВУ ЦИТОСТАТИЧНИХ СПОЛУК ПОХІДНОГО ДИГІДРОПІРОЛУ ТА 5-ФТОРУРАЦИЛУ НА ГІСТОЛОГІЧНУ СТРУКТУРУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ЗА УМОВ ХЕМОІНДУКОВАНОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗУ

Резюме. Наведено результати дослідження морфофункціонального стану печінки щурів при 7-тижневому введенні похідного дигідропіролу, що проявляє цитостатичні ефекти, у порівнянні з впливом традиційного протипухлинного препарату 5-фторурацилу. Встановлено, що похідне дигідропіролу чинить незначний пошкоджуючий вплив на печінку щурів, тоді як введення 5-фторурацилу викликає виражений гепатотоксичний ефект, що проявляється у дистрофічних змінах гепатоцитів.

Ключові слова: похідне дигідропіролу, 5-фторурацил, печінка, цитостатики, гепатотоксичність.

Вступ

Останнім часом все більшої популярності здобуває напрямок таргетної терапії онкологічних захворювань, який ґрунтується на цільовій дії терапевтичного агента, тобто впливає на конкретні онкопротеїни - важливі ланки сигнальних шляхів, які порушуються при канцерогенезі. Одними з основних мішеней для препаратів таргетного спрямування є протеїнкінази, тому активно ведуться пошуки інгібіторів їх ферментативної активності [Thaimattam et al., 2007]. Для таких сполук характерна висока специфічність до молекул-мішеней, що обумовлює цитостатичний ефект у малігнізованих клітинах, а також низька токсичність при тривалому застосуванні.

Перспективними сполуками в якості препаратів таргетної дії є похідні дигідропіролу, які, завдяки просторовій структурі молекул, можуть взаємодіяти з АТФ-зв'язуючим центром протеїнкінази і ефективно їх блокувати [Wu et al., 2006]. Науково-виробничим хіміко-біологічним центром Київського національного університету імені Тараса Шевченка було синтезовано похідне дигідропіролу (Д1, 5-аміно-4-(1,3-бензотіазол-2-іл)-1-(3-метоксифеніл)-1,2-дигідро-3Н-пірол-3-он) [Дубініна, Воловенко, 2007], яке показало протипухлинну активність та відсутність токсичного впливу на слизову оболонку кишечника за умов моделювання колоректального раку у щурів [Кузнецова, 2011].

Ураження печінки, як одного з головних органів детоксикації, лежить в основі побічних ефектів лікарських засобів [Зими́на, 1988]. Тому метою даного дослідження була оцінка впливу похідного дигідропіролу на стан печінки щурів при 7-тижневому пероральному введенні, за умов моделювання раку товстого кишечника щурів за допомогою 1,2-диметилгідразину (ДМГ) [Perse et al., 2005], а також порівняння ефектів впливу похідного дигідропіролу і традиційного протипухлинного препарату 5-фторурацилу (5-ФУ, 2,4-діокси-5-фторпіримідин) [Гарин, 2000].

Матеріали та методи

Дослідження проводили на 90 безпорідних статевозрілих щурах-самцях. Речовини вводили наступним

чином: похідне дигідропіролу (Д1) (2,3 мг/кг маси тіла) per os щоденно розчиненим у соняшниковій олії (0,1 мл), що містила 15% ДМСО (0,1 мл); 5-ФУ (45 мг/кг маси тіла) - підшкірно щотижнево (0,32-0,34 мл залежно від маси тіла); ДМГ (20 мг/кг маси тіла) - підшкірно щотижнево розчиненим у фізіологічному розчині з нейтральним рН (0,1 мл). Експериментальні тварини були рандомізовано розділені на 7 груп: I - Д1, 7 тижнів; II - 5-ФУ, 7 тижнів; III - ДМГ, 20 тижнів; IV - ДМГ, 20 тижнів, потім Д1, 7 тижнів; V - ДМГ, 20 тижнів, потім 5-ФУ, 7 тижнів; VI - Д1 і 5-ФУ одночасно, 7 тижнів; VII - ДМГ, 20 тижнів, потім Д1 і 5-ФУ одночасно, 7 тижнів. Тварини контрольної групи отримували відповідні розчинники за вищевказаними схемами. Щури експериментальних груп також отримували розчинники замість речовин, дія яких не досліджувалась у даних групах. Також була група інтактних тварин.

Щурів виводили з експерименту через 1 добу після останнього введення досліджуваних речовин шляхом декапітації під ефірним наркозом. Для гістологічних досліджень брали фрагменти печінки, які фіксували у суміші Буена. Виготовляли парафінові зрізи і забарвлювали гематоксиліном та еозином за стандартною методикою для подальшої оглядової мікроскопії. Морфометричні параметри вимірювали за допомогою програми ImageJ 1.45 на цифрових мікрофотографіях, які були зроблені з використанням камери Delta Optical HDCE-50 та мікроскопа Bresser Trino Researcher. Статистичну обробку морфометричних даних проводили з використанням програм статистичного пакету аналізу даних Microsoft Excel 2010 для персонального комп'ютера з використанням t-критерію Стьюдента.

Результати. Обговорення

При гістологічному дослідженні печінки тварин контрольної групи не виявлено ознак патологічних процесів, відсутні відмінності між дослідними та інтактним контролем. Під впливом Д1 протягом 7 тижнів цитоплазма гепатоцитів була більш зернистою в обох зонах, у перипортальній зоні значна кількість клітин мала більш еозинофільну цитоплазму. Відносно контролю спосте-

рігалося збільшення площі поперечного перерізу гепатоцитів обох зон печінкової часточки (табл. 1). Виявлялись ознаки помірного поліморфізму ядер (рис. 1), достовірних змін площі ядер обох зон порівняно з контролем не виявлено. Просвіти синусоїдів були розширені у більшості випадків (табл. 1), судини портальних трактів незначно розширені, у деяких судинах спостерігався стаз крові. Окремі ділянки печінки мали ознаки запалення. Виявлені морфологічні зміни, викликані введенням Д1, свідчать про активізацію процесів детоксикації у клітинах печінки та незначний гепатотоксичний ефект похідного дигідропіролу.

При дії 5-ФУ протягом 7 тижнів цитоплазма гепатоцитів обох зон неоднорідна, заповнена великими базофільними гранулами, площа клітин перипортальної зони значно збільшена (табл. 1). У перипортальній зоні спостерігалась велика кількість гіперхромних ядер (рис. 2), не виявлено достовірних змін площі ядер відносно контролю. Синусоїди не були розширеними (табл. 1). Подекуди спостерігалось повнокрів'я центральних вен, а також лімфоїдна інфільтрація навколосудинних ділянок. Такі зміни гістологічної структури печінки вказують на гепатотоксичність 5-ФУ, яка є більш вираженою у порівнянні з Д1.

При введенні тваринам ДМГ мають місце суттєві порушення гістоархітекtonіки печінки, що є характерним при введенні даної сполуки [Линчак та ін., 2012]. Часто зустрічались зони, у яких структура печінкових балок порушена, гепатоцити централобулярної та перипортальної зон печінкової часточки виглядають набряклими, з неоднорідною цитоплазмою, у деяких клітин компоненти цитоплазми зміщені від ядра до периферії. Зростає площа поперечного перерізу гепатоцитів обох зон (табл. 1). Велика кількість гепатоцитів обох зон містить збільшені у розмірах ядра (табл. 1), проте деякі клітини мають зморшкуваті ядра (рис. 3). Помітне повнокрів'я розширених (табл. 1) внутрішньодолькових синусоїдних гемокапілярів у більшості випадків. Зустрічається

венозна гіперемія та значна лімфоїдна інфільтрація портальних трактів.

Морфологічний стан печінки щурів, які отримували Д1 протягом 7 тижнів на тлі ДМГ-індукованого канцерогенезу (рис. 4), в цілому відповідає показникам групи, що отримувала тільки канцероген (табл. 1). Подекуди балкова структура печінки порушена, цитоплазма гепатоцитів обох зон неоднорідна, у перипортальній зоні багато клітин мають більш еозинофільну цитоплазму в порівнянні з контролем. Виявлялись ознаки помірного поліморфізму ядер. Синусоїдні гемокапіляри розширені (табл. 1). Помітні запальні процеси у портальних трактах. Ендотелій багатьох центральних вен потовщений, спостерігався стаз крові. Таким чином, введення Д1 протягом 7 тижнів після відміни канцерогену не послаблює ушкоджуючого впливу ДМГ на печінку щурів.

У групі, яка отримувала 5-ФУ протягом 7 тижнів після відміни ДМГ печінка щурів має порушення гістологічної структури. Гепатоцити обох зон набрякли, їх площа збільшена (табл. 1), зустрічались ділянки із гепатоцитами, компоненти цитоплазми яких значно зсунуті на периферію клітин. Багато ядер клітин мають неправильну форму (рис. 5), площа ядер обох зон також зростала відносно контролю (табл. 1). Синусоїди незначно розширені (табл. 1). Спостерігалась лімфоїдна інфільтрація сполучної тканини навколо триадних ділянок. Таким чином, традиційний протипухлинний препарат 5-фторурацил за умов хемоіндукованого колоректального канцерогенезу демонструє значну гепатотоксичність, прояви якої є більш вираженими ніж у групах, що отримували 5-ФУ та ДМГ окремо.

Після сумісної дії Д1 та 5-ФУ протягом 7 тижнів стан централобулярної зони печінки аналогічний групі, що отримувала лише Д1, а у перипортальній зоні помітний прояв впливу 5-ФУ. Гепатоцити набрякли, деякі мають неоднорідну цитоплазму, площа клітин перипортальної зони помітно збільшена (табл. 1). Синусоїди мають нор-

Таблиця 1. Вплив Д1, 5-ФУ та їх комбінацій на стан печінки щурів при ДМГ-індукованому канцерогенезі протягом 7 тижнів (M±m).

Група	Площа поперечного перерізу, мкм ²				Діаметр синусоїдних гемокапілярів, мкм
	Централолюбулярна зона		Перипортальна зона		
	Гепатоцитів	Ядер гепатоцитів	Гепатоцитів	Ядер гепатоцитів	
Контроль	310,07±3,03	46,23±0,31	282,74±2,58	45,21±0,28	4,37±0,08
I - Д1	348,45±2,14*	48,57±0,33	318,47±2,78*	46,16±0,32	4,81±0,07*
II - 5-ФУ	333,98±2,51	45,32±0,32	317,98±2,84*	44,25±0,27	4,52±0,07
III - ДМГ	366,61±1,50*	55,59±0,16*	350,5±1,97*	51,02±0,34*	5,12±0,04*
IV - ДМГ + Д1	364,32±1,81*	55,49±0,15*	358,07±1,77*	52,04±0,29*	5,31±0,04*
V - ДМГ + 5-ФУ	355,97±2,00*	55,82±0,14*	349,06±2,19*	52,19±0,28*	5,04±0,04*
VI - Д1 + 5-ФУ	329,8±3,00	45,19±0,31	322,07±2,83*	44,01±0,29*	4,75±0,07
VII - ДМГ + Д1+ 5-ФУ	359,96±1,73*	56,19±0,16*	342,77±2,39*	51,34±0,31*	5,29±0,03*

Примітка: *p<0,05 порівняно з контролем.

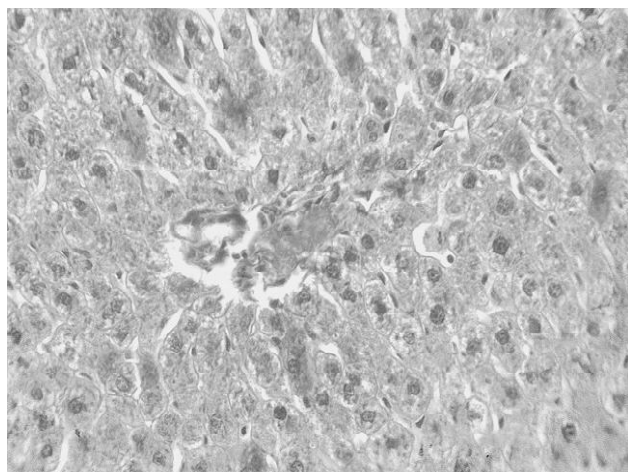


Рис. 1. Перипортальна зона печінки щура після 7-тижневого введення Д1. Гематоксилін-еозин. x400.

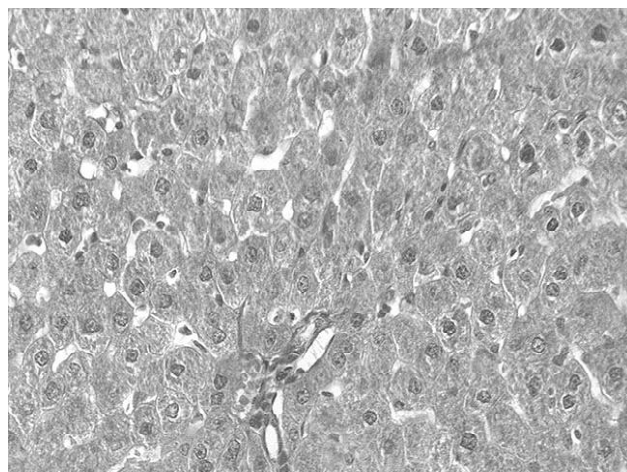


Рис. 2. Перипортальна зона печінки щура після 7-тижневого введення 5-ФУ. Гематоксилін-еозин. X400.

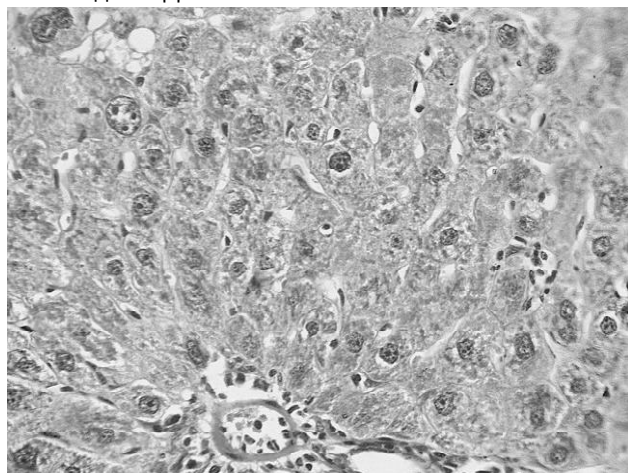


Рис. 3. Перипортальна зона печінки щура при хемоіндукованому канцерогенезі кишечника. Гематоксилін-еозин. x400.

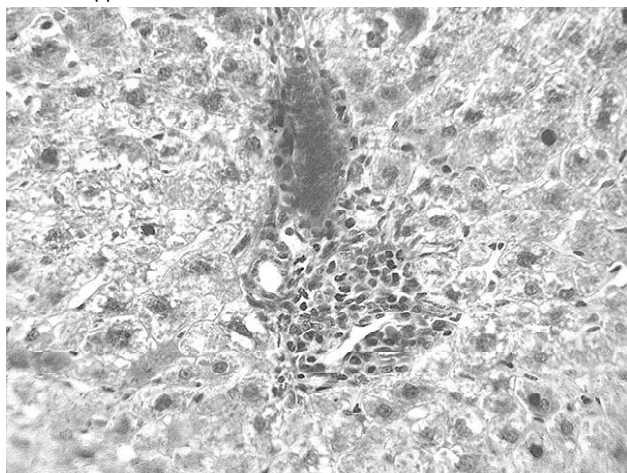


Рис. 4. Перипортальна зона печінки щура після 7-тижневого введення Д1 на фоні хемоіндукованого канцерогенезу кишечника. Гематоксилін-еозин. x400.

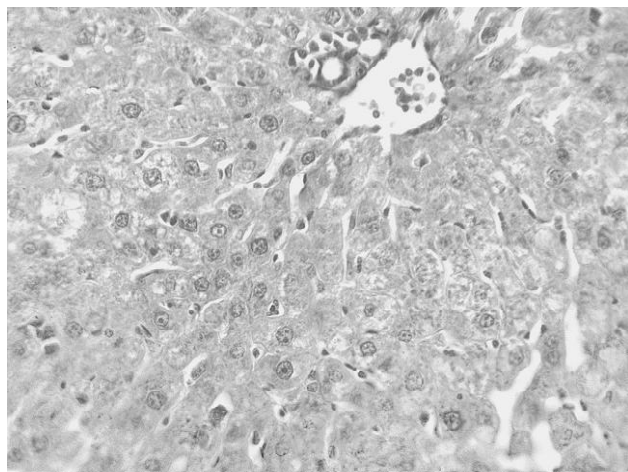


Рис. 5. Перипортальна зона печінки щура після 7-тижневого введення 5-ФУ на фоні хемоіндукованого канцерогенезу кишечника. Гематоксилін-еозин. x400.

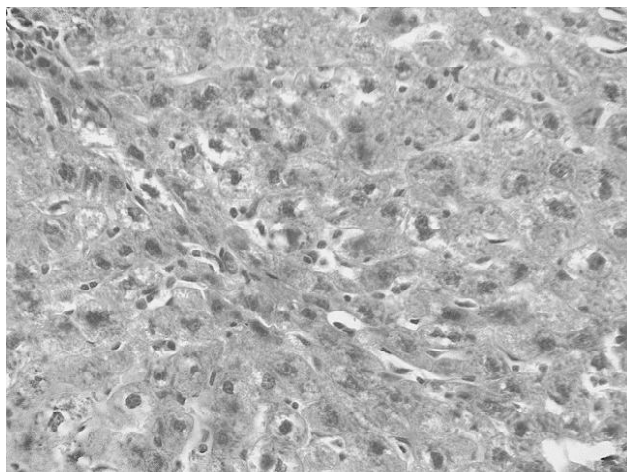


Рис. 6. Перипортальна зона печінки щура після комбінованого введення 5-ФУ та Д1 на фоні хемоіндукованого канцерогенезу кишечника. Гематоксилін-еозин. x400.

мальний просвіт, як у групі, що отримувала лише 5-ФУ. Зустрічаються поодинокі перипортальні зони з ознака-

ми запалення. При комбінованому введенні Д1 та 5-ФУ протягом 7 тижнів після відміни ДМГ знову спосте-

рігалося переважання ефектів канцерогену (табл. 1), загалом печінка тварин цієї групи зазнає найбільших деструктивних змін (рис. 6). У деяких тварин спостерігалась дисконкомплексція печінкових балок. Гепатоцити централобулярної та перипортальної зон мають дистрофічні зміни, їх площа збільшена (табл. 1), компоненти цитоплазми зсунуті на периферію клітин. Ядра гепатоцитів обох зон значно збільшені (табл. 1). Синусоїди розширені (табл. 1). Ознаки запальних процесів зустрічаються досить часто.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Новосинтезоване похідне дигідропіролу з цитостатичними властивостями при введенні протягом 7

тижнів чинить незначний токсичний вплив на печінку щурів, що є меншим, ніж при дії традиційного протипухлинного препарату 5-фторурацилу.

2. При ДМГ-індукованому канцерогенезі товстого кишечника печінка щурів зазнає істотних морфологічних змін, які домінують над ефектами Д1, тоді як введення 5-ФУ після канцерогену спричинює більш виражений токсичний вплив на печінку.

3. Сумісний вплив двох цитостатиків спричинює певні порушення гістологічної структури печінки, у яких домінуючими є ефекти впливу 5-фторурацилу.

В наступних дослідженнях планується поглиблено вивчити дію похідного дигідропіролу на печінку щурів за допомогою різноманітних гістохімічних методів, а також вивчити вплив сполуки на інші частини організму.

Список літератури

- Гарин А.М. Химиотерапия диссеминированного рака ободочной кишки, очередность назначения цитостатиков //Практическая онкология.- 2000.- Т.1.- С.27-30.
- Дубініна Г.Г. Пат. 22204 (UA), АБ1К31/40. Сполука 1,4-заміщених 5-аміно-1,2-дигідропірол-3-онів, що має протиракову активність /Дубініна Г.Г., Воловенко Ю.М.- Опубл. 25.04.2007, Бюлл. № 5.
- Зими́на Л.Н. Лекарственная гепатонепропатия /Л.Н.Зими́на, Г.С.Галкина //Архив патол.- 1988.- Т.50, Вып.5.- С.58-65.
- Кузнецова Г.М. Протипухлинна дія цитостатичної сполуки похідного дигідропіролу при хемо-індукованому канцерогенезі товстої кишки щурів /Г.М.Кузнецова //Проблеми екологічної та мед. генетики і клін. імунології.- 2011.- Вип. 5 (107).- С.66-74.
- Гепатотоксичність 1,2-диметилгідразину при моделюванні колоректального раку у щурів /О.В.Линчак, В.К.Рибальченко, Н.О.Карпезо [та ін.] //Совр. пробл. токсикол.- 2012.- Т.56, №1.- С.
- Perse M. The dimethylhydrazine induced colorectal tumours in rat-experimental colorectal carcinogenesis /M.Perse, A.Cerar //Radiol. Oncol.- 2005.- Vol.39, №1.- P.61-70.
- Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity /R.Thaimattam, R.Banerjee, R.Migliani [et al.] //Curr. Pharm. Des.- 2007.- Vol.13, №27.- P.2751-2765.
- Wu H.-Ch. Targeted Therapy for Cancer /H.-Ch.Wu, D.-K.Chang, Ch.-T.Huang //J. of Cancer Molecules.- 2006.- Vol.2, №2.- P.57-66.

Данилов М.А., Линчак О.В., Островская Г.В., Рыбальченко В.К.

СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЦИТОСТАТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРОИЗВОДНОГО ДИГИДРОПИРРОЛА И 5-ФТОРУРАЦИЛА НА ГИСТОЛОГИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ПЕЧЕНИ КРЫС В УСЛОВИЯХ ХЕМОИНДУЦИРОВАННОГО КАНЦЕРОГЕНЕЗА

Резюме. Представлены результаты исследования морфофункционального состояния печени крыс при 7-недельном введении производного дигидропиррола, проявляющего цитостатические эффекты, в сравнении с влиянием традиционного противоопухолевого препарата 5-фторурацила. Установлено, что производное дигидропиррола оказывает незначительное повреждающее влияние на печень крыс, тогда как введение 5-фторурацила вызывает выраженный гепатотоксический эффект, который проявляется дистрофическими изменениями гепатоцитов.

Ключевые слова: производное дигидропиррола, 5-фторурацил, печень, цитостатики, гепатотоксичность.

Danylov M. O., Lynchak O. V., Ostrovska G. V., Rybalchenko V. K.

COMPARISON OF THE EFFECTS OF CYTOSTATIC COMPOUNDS DIHYDROPIRROLE DERIVATIVE AND 5-FLUOROURACIL ON THE RATS' LIVER HISTOLOGICAL STRUCTURE UNDER CONDITIONS OF COLON CARCINOGENESIS

Summary. The results of the study of morphofunctional state of the rats' liver at the 7 weeks administration of dihydropyrrole derivative which reveals the cytostatic effects in comparison with traditional anticancer drug 5-fluorouracil are shown. It was determined that the dihydropyrrole derivative exhibits little damaging effect on the rats' liver, and the administration of 5-fluorouracil caused pronounced hepatotoxic effect.

Key words: dihydropyrrole derivative, 5-fluorouracil, liver, cytostatics, hepatotoxicity.

Стаття надійшла до редакції 05.12.2013р.

Данилов Максим Олександрович - аспірант кафедри цитології, гістології та біології розвитку Навчально-наукового центру "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка; +38 044 526-54-48; boresvet@ukr.net
Линчак Оксана Валеріївна - к. біол. н., молодший науковий співробітник НДС "Мембранології і цитології" Навчально-наукового центру "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка; +38 044 526-54-48; linchak@univ.kiev.ua

Островська Галина Віталіївна - д. біол. н., професор кафедри цитології, гістології та біології розвитку ННЦ "Інститут біології"; +38 044 526-54-48; g_ostrovska@univ.kiev.ua

Рибальченко Володимир Корнійович - д. біол. н., професор, зав. НДС "мембранології і цитології" Навчально-наукового центру "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка; +38 044 526-54-48; rybalchenko@univ.kiev.ua